『KOD -Plus- Mutagenesis Kit』を用いたルシフェラーゼ遺伝子へのHis-tag挿入、及びアミノ酸点変異ライブラリーの作製

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　杉山 明生

はじめに

Site-directed mutagenesis（部位特異的変異導入法）は、従来Kunkel法に代表されるように煩雑で時間の掛かるステップを伴いましたが、今日ではPCR法を応用した様々な方法が開発され、比較的簡便に行える手法となりました。しかしながら、変異導入率、簡便さ、導入できる変異の種類、あるいは、目的とする変異以外の変異の挿入率（2nd-site mutation）といった観点でみた場合、何れの方法も一長一短あるのが実情でした。

KOD -Plus- Mutagenesis Kit（図1）は、高正確性PCR酵素KOD -Plus-の高い正確性を活かした、Inverse PCR（iPCR）法に基づく部位特異的変異導入キットです。

Inverse PCR法の採用により、数bpの置換、挿入、欠失のみならず、数10bpの挿入や数100bpの欠失等、様々な種類の変異を高い効率で導入することができます（図2）。また、反応条件の最適化により、PCRエラーによる2nd-site mutationが入る可能性が最小限に抑えられており、さらに、大変簡便なプロトコールとなっています（図3）。

本稿では、KOD -Plus- Mutagenesis Kitを用いてルシフェラーゼ遺伝子へのHis-tag配列の挿入、及びアミノ酸点変異ライブラリーを作製した例をご紹介いたします。



図1．KOD -Plus- Mutagenesis Kit外観
変異導入に必要な全ての試薬及び詳細なプロトコールが添付されています。

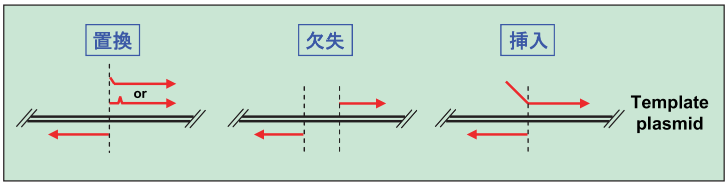


図2．Inverse PCR法における置換、欠失、挿入の各変異導入プライマーの設計例

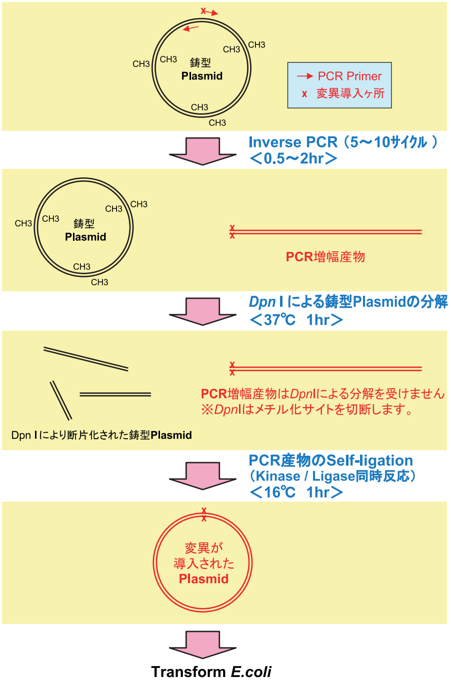


図3．KOD - Plus- Mutagenesis Kitを用いたInverse PCR法による変異導入フロー

ルシフェラーゼ遺伝子へのHis-tag配列の挿入

方　法

新規高発光ルシフェラーゼ:Emerald Luc（⇒一口メモ参照）の発現plasmid（大腸菌用）を鋳型として、タグ配列の導入実験を行いました。

プライマーは、図4に示すように、開始コドン直後にヒスチジンが6残基連続して挿入されるように設計しました。すなわち、開始コドン直後の配列（20塩基）に、ヒスチジン6残基をコードする配列CATCACCATCACCATCACを5' 側に付加し、Primer#1としました。また、逆方向のprimerには、開始コドンの位置から25merの相補鎖をPrimer#2としました。

PCR、*Dpn*I処理、リン酸化、及びライゲーションの工程は、キット添付の取扱説明書に従い、最終的に大腸菌コンピテントセルDH5α（Code No.:DNA-903）の形質転換を行いました。

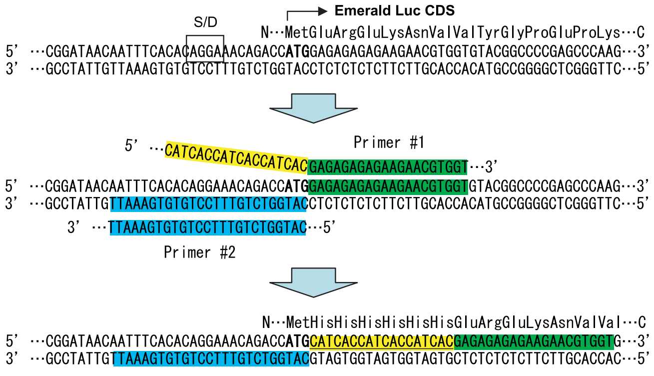


図4．ルシフェラーゼ（Emerald Luc）遺伝子へのHis-tag配列の挿入

結果及び考察

形質転換後、得られたコロニーから12クローンをサンプリングして、シーケンシングを行いました。その結果、12クローン全てにおいてHis-tag配列をコードする塩基配列の挿入が確認できました。

また、実際に変異導入遺伝子がHis-tag融合タンパク質として発現されることを確認するため、His-tag配列を挿入したplasmidを有する大腸菌を培養した後、His-tag融合タンパク質精製キットMagExtractor™ -His-tag-（Code No.:NPK-701）を用いてルシフェラーゼの精製を行いました。その結果、精製タンパク質は、SDS-PAGEにて予想通りの位置にバンドを示すとともに、発光基質を加えることにより発光を検出することもできました（図5）。

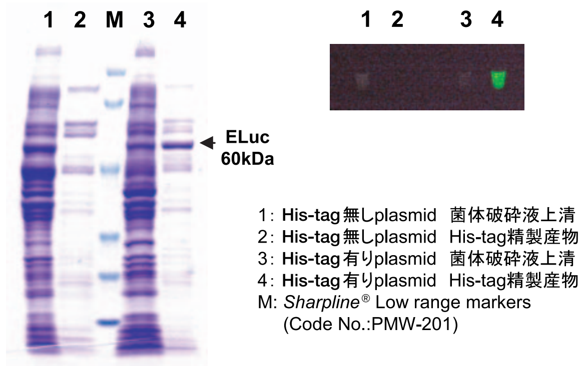


図5．His-tag配列を挿入したルシフェラーゼ（ELuc）のHis-tag精製結果（A）及び精製ルシフェラーゼの発光による検出（B）

一口メモ

●His-tag配列について

His-tag配列は、ヒスチジン残基が数個以上連続した配列です。ヒスチジン側鎖のイミダゾール環が金属イオン（Ni^{2+}など）をキレートするため、金属イオンと強く結合する性質を有しています。そのため、目的のタンパク質と本配列を融合した形で発現させた産物は、金属イオンを固定化したビースなどにより簡便に精製することが可能です。　なお、本欄では、開始コドン直後のN末にHis-tagを挿入しましたが、目的タンパク質の高次構造によってはC末端に付加した方が良い精製結果が得られる場合もあります。特に、目的タンパク質がN末端にシグナル配列を持つ場合には、C末端に付加する必要があります。

●Emerald Lucについて

ブラジル産ヒカリコメツキムシ由来のルシフェラーゼです。従来のホタルルシフェラーゼに比べ、生細胞において安定で強い発光を観察することができるという特長があります。本誌p1～3をご参照ください。

ルシフェラーゼ遺伝子のアミノ酸点変異ライブラリーの作製（Saturation Mutagenesis）

次に、T. Nakatsu らの文献（*Nature*. 2006 Mar 16;440（7082）:372-6.）を参考に、Emerald Lucの発光波長に関与していると予想される282番目のイソロイシン（Ile）をターゲットにアミノ酸点変異ライブラリーを作製しました。

方　法

プライマーは、図6に示すように、282番目のIleに対応するコドンの位置をNNNにして、3箇所に4種類全ての塩基（すなわち64通りの塩基の組み合わせ）が挿入されるように設計しました。これをPrimer#3とし、また、逆方向のprimerには、背中合わせの25merの相補鎖をPrimer#4としました。これらのprimerを用いてキット添付の取扱説明書に従い変異導入を実施し、大腸菌コンピテントセルDH5α（（Code No.:DNA-903）の形質転換を行いました。

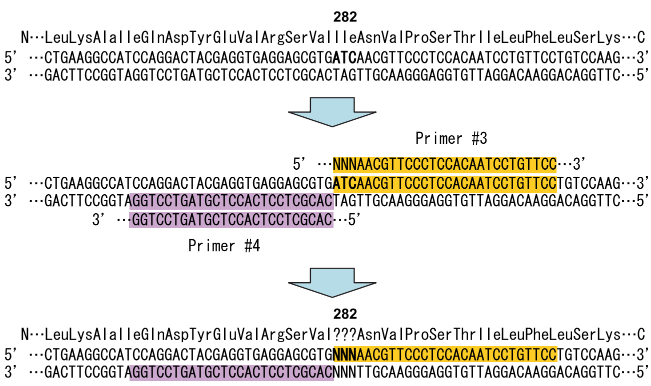


図6．ルシフェラーゼ（Emerald Luc）遺伝子のアミノ酸点変異ライブラリーの作製

結果及び考察

形質転換後、得られたコロニーから96クローンをサンプリングしてシーケンシングを行い、変異導入部位の塩基配列を調べました。その結果（表1）、GGGの9クローンを最多に、39種類の異なるコドンを持つ変異体を得ることができました。これらは、アミノ酸レベルでは、Gln, Lysを除く18種類のアミノ酸に対応し、野生型のIle以外に17種類の変異体が得られたことになります。今回は、96クローンのみのスクリーニングでしたが、n数を増やして行うことにより、さらに幅広い変異体を取得することができると考えられます。

次に、実際にこれらのルシフェラーゼ変異体の発光波長が変化しているかを調べるために、上で得られた17種類の変異体及び野生型を培養し、それらの発光スペクトルの測定を行いました（図7）。その結果、測定できた変異体では、最大発光波長（λmax）が赤色側へシフトしていることが観察できました（表2）。

表1．変異導入部位の塩基配列解析結果（得られたクローンのコドンとその個数）

No.	コドン	アミノ酸	クローン数
1	GGG	Gly	9
2	GCC	Ala	6
3	GTT	Val	5
4	GGT	Gly	4
5	ATG	Met	4
6	GTA	Val	4
7	GTG	Val	4
8	GCT	Ala	3
9	CGT	Arg	3
10	CAT	His	3
11	CTT	Leu	3
12	GCG	Ala	2
13	AGA	Arg	2
14	GAC	Asp	2
15	GGC	Gly	2
16	AGC	Ser	2
17	TGG	Trp	2
18	GCA	Ala	1
19	AGG	Arg	1
20	CGG	Arg	1
21	AAT	Asn	1
22	TGT	Cys	1
23	GAA	Glu	1
24	GAG	Glu	1
25	GGA	Gly	1
26	CAC	His	1
27	ATT	Ile	1
28	CTG	Leu	1
29	TTC	Phe	1
30	CCC	Pro	1
31	CCG	Pro	1
32	TCA	Ser	1

No.	コドン	アミノ酸	クローン数
33	TCT	Ser	1
34	ACA	Thr	1
35	ACC	Thr	1
36	ACG	Thr	1
37	ACT	Thr	1
38	TAT	Tyr	1
39	GTC	Val	1
40	CGA	Arg	0
41	CGC	Arg	0
42	AAC	Asn	0
43	GAT	Asp	0
44	TGC	Cys	0
45	CAA	Gln	0
46	CAG	Gln	0
47	ATA	Ile	0
48	ATC	Ile	0
49	CTA	Leu	0
50	CTC	Leu	0
51	TTA	Leu	0
52	TTG	Leu	0
53	AAA	Lys	0
54	AAG	Lys	0
55	TTT	Phe	0
56	CCA	Pro	0
57	CCT	Pro	0
58	AGT	Ser	0
59	TCC	Ser	0
60	TCG	Ser	0
61	TGA	Stop	0
62	TAA	Stop	0
63	TAG	Stop	0
64	TAC	Tyr	0
Primer内に塩基欠質等がある			12
配列解析不可			2
合計			96

表2．本実験で得られたルシフェラーゼ変異体の最大発光波長

No.	282番目アミノ酸種類	最大発光波長 λmax (nm)
1	Asn	575
2	Thr	550
3	Ser	560
4	Met	565
5	His	ND
6	Pro	ND
7	Arg	ND
8	Leu	ND
9	Glu	ND
10	Asp	ND
11	Ala	560
12	Gly	564
13	Val	552
14	Tyr	557
15	Trp	ND
16	Cys	558
17	Phe	563
18	Ile (Wild Type)	541

ND:Not Determined

*図7及び表2は、産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門　近江谷克裕先生、中島芳浩先生にご提供いただきました。

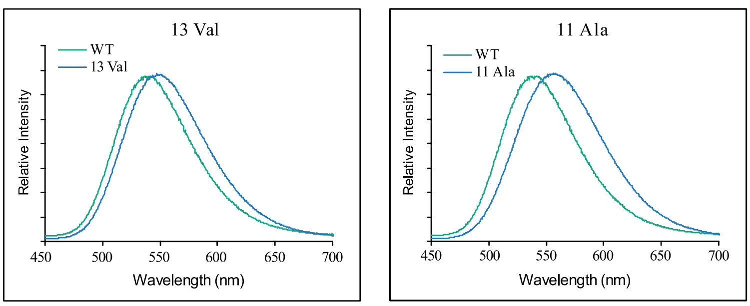


図7．Val変異体及びAla変異体の発光スペクトル（一例）

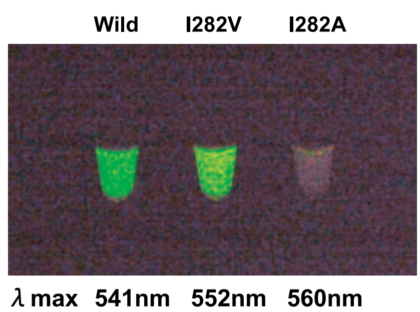


図8．野生型、Val変異体、及びAla変異体の発光

まとめ

KOD -Plus- Mutagenesis Kitを用いたInverse PCR法では、本稿でご紹介したtagの挿入やアミノ酸点変異ライブラリーの作製などに加え、数100bpの欠失等、様々な変異導入が可能です。KOD - Plus- Mutagenesis Kitを是非一度お試しください。

品名及び内容	包　装	保存温度	Code No.	価　格
KOD -Plus- Mutagenesis Kit	20回用	-20℃	SMK-101	¥38,000

*本製品には、以下の試薬が含まれています。KOD -Plus-, 10x Buffer for iPCR, 2mM dNTPs, *Dpn* I, T4 Polynucleotide Kinase, Ligation high, Control Plasmid, Control Primer #1, Control Primer #2.